Prueba Trioplex RCP-TR en tiempo real

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

Para usar solamente conforme a una autorización de uso de emergencia

Indicaciones para el uso

Índice

Introducción.....3
Especímenes.....4
Equipos e insumos.....6
Control de calidad.....7
Extracción de ácido nucleico.....10
Algoritmo de pruebas.....12
Prueba RCP-TR.....13
Interpretación de resultados de pruebas.....21
Limitaciones de la prueba.....26
Características de desempeño.....27
Referencias.....41

Introducción

PROPÓSITO

Este documento describe el uso de las pruebas RT-PCR en tiempo real (TaqMan®) para la detección y diferenciación del ARN de los virus del dengue, chikunguña y Zika en el suero, el líquido cefalorraquídeo (LCR) y para la detección del ARN del virus del Zika en la orina y el líquido amniótico. Este protocolo se ha diseñado para facilitar la detección simultánea de la presencia de los virus del dengue, chikunguña y Zika, utilizando una única muestra.

NOTA: En esta prueba (Trioplex RCP-TR en tiempo real), los análisis para los virus del dengue, chikunguña y Zika se realizan en la misma placa de pocillos de RCP-TR (multiplex).

USO PREVISTO

La prueba Trioplex RCP-TR en tiempo real (Trioplex RCP-TR) tiene como objetivo la detección y diferenciación cualitativas del ARN de los virus del dengue, chikunguña y Zika en sueros o líquido cefalorraquídeo humanos (obtenidos con el espécimen de suero coincidente de un paciente), y para la detección cualitativa del ARN del virus del Zika en la orina y el líquido amniótico (cada uno obtenido con el espécimen de suero de un paciente). La prueba se ha concebido para utilizarse con los especímenes obtenidos de personas que cumplen los criterios clínicos de los CDC para el virus del Zika (p. ej., síntomas y signos clínicos asociados a la infección por el virus del Zika) y/o los criterios epidemiológicos de los CDC para el virus del Zika (p. ej., antecedentes de haber vivido en, o viajado a, un área geográfica con transmisión activa del zika en el momento del viaje, u otros criterios epidemiológicos para los que se pueda indicar la prueba para el virus del Zika como parte de una investigación de salud pública). Las pruebas se realizan en laboratorios calificados, designados por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés).

Los resultados de las pruebas se utilizan para la identificación del ARN viral del zika, dengue y chikunguña. El ARN viral se detecta generalmente en el suero durante la fase aguda de la infección (aproximadamente 7 días después de la aparición de los síntomas, en caso de presentarse). Los resultados positivos indican la presencia de infección actual. Los laboratorios tienen la obligación de reportar todos los resultados a las autoridades de salud pública correspondientes. En los Estados Unidos y sus territorios, los resultados deben reportarse a los CDC.

Los resultados de Trioplex RCP-TR negativos no descartan las infecciones por los virus del dengue, chikunguña y/o Zika y no se deben utilizar como el único elemento para la toma de decisiones en cuanto al manejo de los pacientes. Los resultados negativos deben combinarse con las observaciones clínicas, los antecedentes del paciente y la información epidemiológica.

El Trioplex RCP-TR se ha concebido para ser utilizado por personal de laboratorio capacitado, que sea competente en la realización de pruebas RCP-TR en tiempo real. La prueba solo debe utilizarse según la autorización de uso de emergencia de la Administración de Alimentos y Medicamentos.

LIMITACIONES PARA EL USO DEL PROTOCOLO

La prueba Trioplex RCP-TR en tiempo real que aquí se describe no ha sido probada extensamente con especímenes clínicos. No se permiten modificaciones de estas pruebas (es decir, el uso de instrumentos de RCP o sustancias químicas diferentes de los que se describen). Estas pruebas no deben publicarse sin el consentimiento explícito de los CDC.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba Trioplex RT-PCR en tiempo real incluye las sondas de hidrólisis (Taqman®) de cebadores y doble etiquetado para utilizarse en la detección cualitativa del ARN del virus del Zika, aislado de especímenes clínicos que incluyen suero (de los tubos con separador de suero), LCR, orina y líquido amniótico. Un paso de transcripción inversa produce ADNc del ARN presente en la muestra. La sonda se une al ADN diana entre los dos cebadores de RCP sin etiquetas. Para la sonda específica para el virus del dengue, la señal del colorante fluorescente (FAM) en el terminal 5' se inhibe mediante BHQ-1 en su terminal 3'. Para la sonda específica para el virus chikunguña, la señal del colorante fluorescente (HEX) en el terminal 5' se inhibe por BHQ-1 en su terminal 3'. Para la sonda específica para el virus del Zika, la señal del colorante fluorescente (Texas Red [TxRd]) en el terminal 5' se inhibe por BHQ-2 en su terminal 3'. Durante la RCP, la polimerasa Taq extiende los cebadores sin etiquetas utilizando la cadena modelo como guía, y cuando alcanza la sonda, se divide en esta separando el colorante del inhibidor, lo que permite la fluorescencia. El instrumento de RCP en tiempo real detecta esta fluorescencia del colorante no inhibido. Con cada ciclo de RCP, más sondas se dividen, lo que provoca un aumento de la fluorescencia, la cual es proporcional a la cantidad de ácido nucleico diana presente.

Especímenes

ESPECÍMENES ACEPTABLES

Pruebas para los virus del Zika, chikunguña y dengue:

- Suero (recolectarse en un tubo separador de suero)
  El tubo debe centrifugarse antes del envío para evitar la hemólisis.
- Líquido cefalorraquídeo

Solo para las pruebas del zika:

- Orina
- Líquido amniótico

NOTA: El suero es el espécimen de diagnóstico por excelencia. El LCR, la orina y el líquido amniótico solo pueden someterse a pruebas cuando se envía junto con el espécimen de suero coincidente de un paciente.

MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE ESPECÍMENES

- Al transportar especímenes humanos, cerciórese que se cumplen todas las normas aplicables para el traslado de especímenes biológicos potencialmente infecciosos.
- Transportar/enviar especímenes humanos en hielo seco, si es posible, pero se acepta el uso de bolsas de hielo.
- Almacenar los especímenes a ≤ -20°C al recibirlos. Descongelar la muestra y mantenerla en hielo durante su procesamiento. Mantener el resto de la muestra a ≤ -70°C para su almacenamiento a largo plazo.

SEGURIDAD/PRECAUCIONES

Las directrices de bioseguridad en los laboratorios para trabajar con los especímenes del virus del Zika están disponibles en http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html. Se recomienda a los laboratorios realizar una evaluación de riesgos al hacer nuevas pruebas; y las precauciones de seguridad deberían basarse en la evaluación de riesgos del laboratorio. Los virus del dengue y del Zika se consideran microbios patógenos con los que se puede trabajar de forma segura en un laboratorio de nivel 2 de bioseguridad (BSL-2); sin embargo, según las directrices de Bioseguridad en los laboratorios microbiológicos y biomédicos (BMBL, por sus siglas en inglés), los especímenes con sospecha de contener el virus chikunguña deben manipularse bajo las condiciones de BSL-3: http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm.

Este procedimiento debe realizarse teniendo en cuenta la posible naturaleza infecciosa de los especímenes involucrados. El protocolo tiene la intención de detectar los genomas virales; por tanto, se asume que los especímenes contienen el virus. Los trabajadores del laboratorio deben reconocer que este virus produce altos niveles de viremia y los especímenes de casos sospechosos de virus del chikunguña deben tratarse como potencialmente infecciosos. Consulte las directrices de los CDC para laboratorios de salud pública estatales y locales: http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html. Consulte BMBL para obtener más información sobre bioseguridad relacionada con estos virus y las prácticas de bioseguridad en los laboratorios.

Se recomienda la utilización de batas desechables, guantes, lentes de protección adecuados y un gabinete de seguridad biológica para la manipulación de las muestras de suero. La prueba rRT-PCR debe realizarse en un local separado, que se considere libre de los virus del dengue (VDEN), chikunguña (VCHIK) y Zika (VZIK), o de las plantillas de ARN y ADN de cualquier otro virus. Del mismo modo, el procedimiento de extracción del ARN debe realizarse en un local que no sea en el que se amplifique el ARN mediante la RCP-TR. Durante los pasos de amplificación del ácido nucleico, las secciones de genomas virales se amplifican, por lo que las muestras de suero originales y las muestras de prueba deben mantenerse fuera de la sala de la RCP para evitar la contaminación de las muestras.

Equipos e insumos

DESCARGO DE RESPONSABILIDAD: Los nombres de los proveedores o fabricantes se proporcionan como ejemplos de fuentes de productos adecuadas. El uso de nombres comerciales es con fines de identificación solamente y no implica la aprobación por parte de los CDC ni del Departamento de Salud y Servicios Humanos.

MATERIALES PROPORCIONADOS POR LOS CDC

- Set de cebadores y sondas de la prueba Trioplex RCP-TR en tiempo real de los CDC (CDC; catálogo #KT0166). Remítase al prospecto del producto para conocer la información de almacenamiento y caducidad. El set incluye 4 ampollas con el cebador y las sondas para cada agente combinado en un frasco.
  - 1 ampolla, VDEN-F, VDEN-R1, VDEN-R2 y P
  - 1 ampolla, VCHIK-F, R y P
  - 1 ampolla, VZIK-F, R y P
  - 1 ampolla, RP-F, R y P (este es un set de cebador/sonda para la ARNsa P humana y se utiliza para verificar una extracción exitosa)
- Set de control positivo de la prueba Trioplex RCP-TR (CDC; catálogo #KT0167)
  - Control positivo (CP) del VDEN: Virus del dengue inactivo
  - Control positivo (CP) del VCHIK: Virus del chikunguña inactivo
  - Control positivo (CP) del VZIK: Virus del Zika inactivo
  - Control de espécimen humano (HSC): control positivo y control de extracción para RP

MATERIALES NECESARIOS PERO QUE NO SE PROPORCIONAN

- Kits de extracción de ARN (se puede utilizar cualquiera de los siguientes):
  - Kit de aislamiento de ácido nucleico total MagNA Pure LC (192 reacciones) (Roche, catálogo #03 03 85 05001)
  - Kit de AN y ADN de volumen bajo MagNA Pure 96 (Roche, catálogo #06543588001)
  - Minikit de ARN viral Qiagen QIAamp® (catálogo Qiagen #52904 o 52906)
  - Minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAmp® (Qiagen, catálogo #61904)
- Kits mixtos Master de RCP-TR (se puede utilizar cualquiera):
  - Kit de qRT-PCR de un paso SuperScript® III Platinum® (ThermoFisher, catálogo científico # 11732088 y/o 11732020)
  - Kit de RCP-TRq en un solo paso qScript™, Low Rox™ (Quanta, catálogo # 95059-050 y/o 95059-200)
- Agua de grado molecular, libre de nucleasa

EQUIPOS

- Instrumento de RCP en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx (ThermoFisher Scientific; catálogo #446985 o #4406984);
- Mezclador Vortex
- Microcentrífuga
- 96 bloques de pocillos fríos (o hielo)
- Micropipetas (2 o 10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL)
- Micropipetas multicanales (5-50 µL)
- Instrumentos de extracción de ARN automáticos (opcional):
  - Instrumento MagNA Pure LC 2.0 (Roche; catálogo # 05197686001)
  - Instrumento MagNA Pure 96 (Roche; catálogo # 5195322001)

INSUMOS

- Descontaminantes de superficies aceptados
  - DNA Away (Fisher Scientific; catálogo # 21-236-28)
  - RNase Away (Fisher Scientific; catálogo # 21-236-21) Este producto elimina RNasa y ADN.
  - Lejía al 10 % (dilución 1:10 de lejía hipoclorada comercial 5.25-6.0 %)
  - DNA*Zap*™ (ThermoFisher Scientific; cat. #AM9890) o equivalente.
- Guantes desechables de látex y batas desechables
- Rotuladores de laboratorio
- Puntas de pipeta esterilizadas con filtro de aerosol para P2/P10, P40, P200, y P1000
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL
- Gradillas para tubos de microcentrífuga de 1.5 mL
- Placas de reacción de RCP de 0.1 mL (ThermoFisher Scientific; catálogo #4346906 o #4366932) tapones ópticos (Applied Biosystems; catálogo #4323032)
- Kit de película adhesiva óptica MicroAmp® (ThermoFisher Scientific, catálogo #4311971 o #4360954)

Control de calidad

La RCP-TR en tiempo real es un método sensible y debe utilizarse siguiendo estrictamente los procedimientos de control y garantía de calidad. Cumplir con estas directrices ayudará a minimizar la posibilidad de obtener resultados falsos negativos y falsos positivos.

CONSIDERACIONES GENERALES

- El personal debe estar familiarizado con el protocolo y los instrumentos que se utilizan.
- Preservar áreas separadas, equipo médico de uso exclusivo (p. ej., pipetas, microcentrífugas) y suministros (p. ej., tubos de microcentrífugas, puntas de pipeta, batas y guantes) para
  - disposición de reactivos para la prueba
  - manipulación de los ácidos nucleicos extraídos

- Amplificación de RCP-TR en tiempo real

- El flujo de trabajo tiene siempre que proceder unidireccionalmente del área de extracción de ARN/preparación del reactivo (área limpia) a la sala de amplificación de la RCP ("área sucia") para evitar la contaminación de las muestras clínicas con los ácidos nucleicos amplificados.
- Usar batas desechables limpias, que no hayan sido utilizadas previamente, y guantes nuevos sin polvo durante el ajuste del reactivo de la prueba y la manipulación de los ácidos nucleicos extraídos. Cambiarse los guantes cada vez que sospeche que pueden estar contaminados.
- Almacenar los cebadores/sondas y la mezcla maestra de enzimas a la temperatura adecuada (ver prospectos). No usar los reactivos que ya han vencido.
- Mantener los tubos de los reactivos y las reacciones tapados lo más que pueda.
- Usar DNA*Zap*™ (o equivalente) o lejía al 10 % recién preparada para limpiar las superficies.
- No traer ácido nucleico extraído o material amplificado de la RCP al área de preparación de la prueba.
- Usar solamente puntas de pipetas con barrera (filtro) para aerosoles.

CONTROLES DE LA PRUEBA

Los controles de la prueba deben realizarse al mismo tiempo que todas las muestras de la prueba.

Control de la extracción

El control de espécimen humano (HSC, por sus siglas en inglés) es material de células humanas cultivado no infeccioso utilizado como control de extracción y control positivo para el set de cebador y sonda de RNasa P (RP) que se **extrae al mismo tiempo** que las muestras de ensayo y se incluye como muestra durante la configuración de la rRT-PCR. El HSC debe generar resultados negativos con los sets de cebador y sonda de VDEN, VCHIK y VZIK, pero debe ser positivo para RP. El HSC forma parte del set de control positivo de la Trioplex RCP-TR (CDC; catálogo #KT0167).

Controles positivos para los sets de cebador y sonda específicos del agente

- CP DEL VDEN: Virus del dengue inactivo
- CP DEL VCHIK: Virus del chikunguña inactivo
- CP DEL VZIK: Virus del Zika inactivo

Estos componentes del set de control positivo de la Trioplex RCP-TR (CDC; catálogo #KT0167) deben extraerse usando uno de los métodos de extracción de ARN aceptados, aquí descritos. Las alícuotas del ácido nucleico extraído deben ser almacenadas a ≤ -20 °C hasta su uso. Evite congelar y descongelar reiteradas veces.

Nota: Al extraer el material de control positivo, se deben tomar medidas preventivas para evitar la contaminación cruzada. Abrir con cuidado los frascos que contienen el virus inactivo. Cambiar o descontaminar los guantes entre un frasco y otro. Se deben tomar medidas preventivas similares al manipular el material de control positivo extraído.

Set de cebador y sonda de RNasa P (RP)

Las muestras clínicas y el HSC deben analizarse en busca del gen RNasa P humano (usando el set de cebador y sonda RP incluido en el kit de Trioplex RCP-TR) para controlar la calidad del espécimen y como indicador de que el ácido nucleico se obtuvo del proceso de extracción. El set de cebadores y sondas RNasa P forma parte del set de cebador y sonda de la Trioplex RCP-TR en tiempo real (CDC; catálogo #KT0166).

Control sin plantilla (NTC, por sus siglas en inglés)

Las reacciones NTC incluyen agua de grado RCP en lugar del ARN del espécimen y debe incluirse en cada mezcla de reacción (uno para la reacción de VZIK, VCHIK y VDEN y uno para la reacción RP) en cada ejecución. El NTC es un control para la contaminación o función indebida de los reactivos de la prueba que provoca resultados falsos negativos.

Tabla 1: Visión general de los controles positivos y negativos

Tipo de control	Nombre del control	Usado para monitorear	VDEN	VCHIK	VZIK	RP	Valores C_T esperados
Positivo	CP DEL VDEN	Fallo sustancial del reactivo, incluida la integridad del cebador y la sonda.	+	-	-	N/A	< 38 C_T
	CP DEL VCHIK		-	+	-	N/D	
	CP DEL VZIK		-	-	+	N/D	
Negativo	NTC	1) Contaminación del reactivo y/o medioambiental durante la configuración de la PCR y 2) función del set de cebador y sonda.	-	-	-	-	Ninguno detectado
Extracción	HSC	1) Contaminación del reactivo y/o medioambiental durante la extracción y 2) extracción exitosa.	-	-	-	+	Ninguno detectado para VDEN, VCHIK y VZIK.
							RP C_T < 38

Extracción de ácido nucleico

Notas sobre la extracción

- Las extracciones de muestras tienen que producir un volumen de ARN o ácido nucleico total suficiente para cubrir todas las pruebas de RCP-TR en tiempo real.
- Solo los especímenes extraídos aceptados que utilizaron uno de los métodos de extracción prescritos pueden analizarse con esta prueba.
- El HSC debe incluirse en cada ciclo de extracción como control de extracción de la muestra.
- Mantener los extractos de ARN del espécimen en bloques fríos o en hielo hasta que se analicen.

Extracción manual

Los especímenes clínicos pueden extraerse utilizando el Minikit de ARN viral QIAamp o el Minikit de ARN viral QIAamp DSP. Siga las instrucciones del fabricante, utilizando los siguientes volúmenes:

Volumen de llenado del espécimen: 140µL
Volumen de elución: 60 µL

Extracción automatizada

- Instrumento MagNA Pure LC 2.0

  Los especímenes clínicos pueden extraerse mediante el Kit de aislamiento de ácido nucleico total MagNA Pure LC en el instrumento de extracción MagNA Pure LC 2.0 de Roche, utilizando uno de los protocolos de purificación: Total NA_variable_elution_volume or Total NA External_lysis. Siga las instrucciones del fabricante.

  Use los siguientes volúmenes con el protocolo Total NA_variable_elution_volume or Total NA External_lysis:

  Volumen de llenado del espécimen: 200 µL
  Volumen de elución: 60 µL

  Con el protocolo Total NA External_lysis protocol, mezclar 200 µL de espécimen con 300 µL de amortiguador de lisis, para alcanzar un volumen total de 500 µL antes de cargarlo al instrumento.

  Volumen de elución: 60 µL

- Instrumento MagNA Pure LC 96

  Los especímenes clínicos pueden extraerse mediante el Instrumento MagNA Pure 96, utilizando el Kit para volúmenes pequeños de AN i ADN viral MagNA Pure 96. Verificar que todos los reactivos estén equilibrados a temperatura ambiente antes de usarlos. Al

configurar el instrumento para un ciclo de extracción, utilizar el AN viral/ADN SV 2.0, luego seleccionar Protocolo de purificación “Viral NA Universal SV 3.0” o “Viral NA Plasma ext lys SV 3.0” Siga las instrucciones del fabricante.

Con el protocolo Viral NA Universal SV 3.0, usar los siguientes volúmenes:

Volumen de llenado del espécimen: 200 µL
Volumen de elución: 100 µl

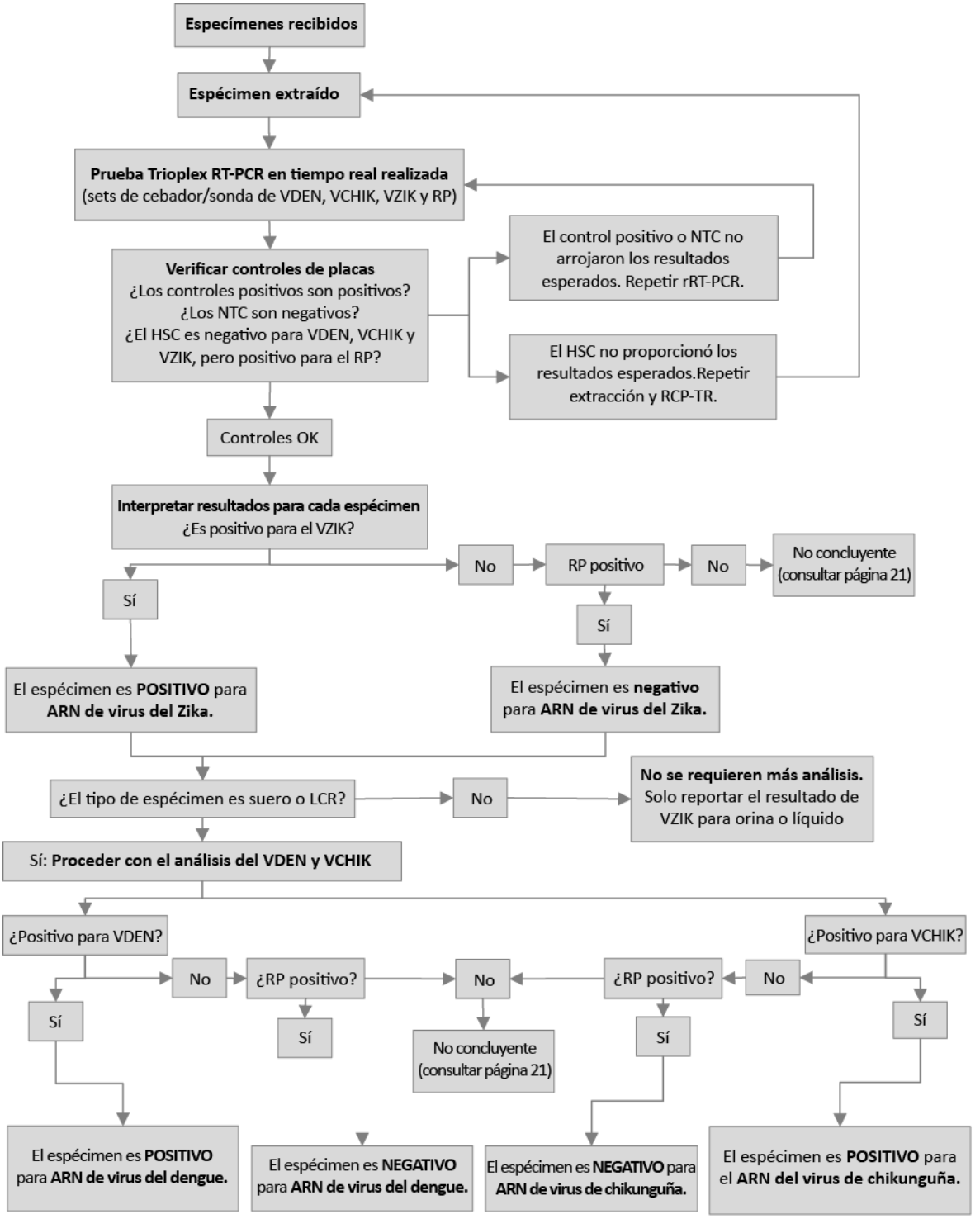
Con el protocolo Viral NA Plasma ext lys SV 3.0, mezclar 200 µL de espécimen con 250 µL de amortiguador de lisis MP 96, para alcanzar un volumen total de 450 µL antes de cargarlo al instrumento.

Almacenamiento de especímenes de ácido nucleico

Mantener los extractos de ARN del espécimen en bloques fríos o en hielo hasta que se analicen.

Si la prueba se tardará más de 24 horas, congelar inmediatamente a ≤ -20ºC. Solo descongelar el número de extractos de ARN que se analizarán en un día. No congelar o descongelar los extractos de ARN más de una vez antes de las pruebas. Para almacenamientos durante largo tiempo, > 7 días, congelar los extractos de ARN a -20ºC. Los extractos de ARN almacenados a -20ºC deben permanecer viables durante 6 meses.

Algoritmo de pruebas



Siga los requisitos de medidas, informes y consultas que se especifican.

Figura 1: Resumen de la interpretación de los resultados de la prueba

Prueba RCP-TR en tiempo real

Preparación de los reactivos

1. **Preparación de cebadores/sondas en tiempo real**
    - Antes de la rehidratación, almacenar los kits a 2-8 °C en un lugar oscuro.
    - Precauciones: Estos reactivos solo deben manipularse en un área limpia y almacenarse a temperaturas apropiadas (ver a continuación) en un lugar oscuro. Se deben evitar los ciclos de congelación-descongelación. Mantener fríos cuando se descongelen.
    - Rehidratar cuidadosamente los reactivos liofilizados en 250 µL de 10 mM Tris, pH de 7.4 a 8.2 o agua de grado RCP (libre de nucleasa) y dejar que se rehidrate durante 15 minutos a temperatura ambiente, en un lugar oscuro.
    - Centrifugar cada tubo para obtener una mezcla uniforme y dividir en alícuotas la mezcla de cebador/sonda en volúmenes de 50 µL en 5 tubos preetiquetados.
    - Almacenar las alícuotas rehidratadas de cebadores y sondas a -20 °C o menos. No almacenar en neveras que no hacen escarcha.
    - Los cebadores y las sondas rehidratados pueden almacenarse congelados hasta 24 meses.
    - Las alícuotas de cebadores y sondas descongeladas pueden almacenarse en un lugar oscuro hasta 4 meses a 2-8 °C cuando su uso es frecuente.
    - No volver a congelar las alícuotas descongeladas.

Tabla 2: Descripciones de cebadores y sondas

Designación de secuencia	Número de parte	Ubicación del gen
VDEN-F	SO3684	5’-UTR
VDEN-R1		
VDEN-R2		
VDEN-P		
VCHIK-F	SO3685	nSP1
VCHIK-R		
VCHIK-P		
VZIK-F	SO3686	Gen de la envoltura
VZIK-R		
VZIK-P		
RP-F	SO3687	Ribonucleasa P humana
RP-P		
RP-P		

2. **Controles de la prueba**
   - Ácido nucleico extraído del virus del dengue inactivo
   - Ácido nucleico extraído del virus del chikunguña inactivo
   - Ácido nucleico extraído del virus del Zika inactivo

3. **Control sin plantilla (NTC)** (no se incluye)
   - Agua estéril libre de nucleasa
   - Alícuota en volúmenes pequeños
   - Utilizado para controlar la contaminación durante la extracción del espécimen y/o la preparación de la placa

4. **Control de la extracción de HSC**
   - El control de espécimen humano debe extraerse y procesarse con cada lote de muestras a analizar, siguiendo el mismo procedimiento que se utiliza con las muestras de pacientes.
   - No diluir el ARN extraído antes de la prueba.

5. **Mezcla maestra**
   NOTA: Se puede utilizar el **Sistema de RT-PCR cuantitativo en un solo paso SuperScript® III Platinum®** o el **kit de qRT-PCR en un solo paso qScript™, Low Rox™**.

   a. **Sistema de qRT-PCR en un solo paso SuperScript® III Platinum®**
      - Colocar la mezcla maestra de RCP 2X y mezcla de enzima Superscript III RT/Platinum Taq en una estantería fría a 2-8 °C.
      - Descongelar completamente el frasco de mezcla maestra de RCP 2X.
      - Mezclar invirtiendo 10 veces la mezcla maestra de RCP 2X.

   b. **Kit de RCP-TRq en un solo paso qScript™, Low Rox™**
      - Descongelar todos los componentes, excepto el TR en un solo paso qScript, a temperatura ambiente.
      - Mezclar vigorosamente.
      - Centrifugar para recoger los contenidos en el fondo del tubo antes de usar.
      - Coloque todos los componentes en hielo después de descongelar.

Preparación del equipo

- Encender el instrumento de RCP en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx y dejar que el bloque alcance la temperatura óptima.
- Realizar la configuración de la placa y seleccionar el protocolo de ciclos en el instrumento (ver Tabla 5).

Configuración de la mezcla maestra y la placa

Nota: **La configuración de la placa puede variar según el número de especímenes y la organización diaria del trabajo. Los controles de NTC y pruebas deben incluirse en cada ciclo.**

- En la campana limpia de la sala de configuración del reactivo, colocar los cebadores/sondas en hielo o en bloque frío. Mantener frío durante la preparación y el uso.
- Descongelar la mezcla de la reacción 2X (SuperScript III o qScript), antes de usar.
- Mezclar los cebadores/sondas centrifugando brevemente.
- Centrifugar brevemente los cebadores/sondas y colocarlos nuevamente en hielo o bloque frío.
- Determinar el número de reacciones (N) a establecer por cada prueba. Es necesario hacer mezclas de reacciones en exceso para las reacciones de NTC y para los errores al pipetear (ver Tabla 2).
- Utilizar la siguiente guía para determinar N:
  - Si el número de muestras (n), incluidos los controles, iguala del 1 al 14, entonces N = n + 1
  - Si el número de muestras (n), incluidos los controles, es mayor de 15, entonces N = n + 2

Preparar la mezcla de la reacción según la siguiente tabla (**Tabla 3**). Mantener la mezcla de la reacción en hielo o bloque frío.

Tabla 3: Mezcla de la reacción de Trioplex RCP-TR

Mezcla de la reacción de TRIOPLEX	
Componente	**Cantidad/Reacción (µL)**
Agua	N x 0.5 µL
Mezcla de la reacción de RCP 2x	N x 12.5 µL
Mezcla de VDEN	N x 0.5 µL
Mezcla de VCHIK	N x 0.5 µL
Mezcla de VZIK	N x 0.5 µL
Mezcla de enzima	N x 0.5 µL
Subtotal	**N x 15 µL**
ARN de muestra	10 µL
TOTAL	**25 µL**

NOTA: Los mismos volúmenes de mezcla de reacción pueden utilizarse para el kit SuperScript III o qScript.

Tabla 4: Mezcla de la reacción de RCP-RP

Mezcla de la reacción del control interno de RP	
Componente	**Cantidad/Reacción (µL)**
Agua	1.5 µL
Mezcla de la reacción de RCP 2x	12.5 µL
Mezcla de RP	0.5 µL
Mezcla de enzima	0.5 µL
Subtotal	**15 µL**
ARN de muestra	10 µL
TOTAL	25 µL

NOTA: Los mismos volúmenes de mezcla de reacción pueden utilizarse para el kit SuperScript o qScript.

Configuración de la placa de RCP

a. En la campana limpia de la sala de configuración del reactivo, mientras se mantiene la placa de PCR en hielo (o bloque frío), añadir 15 µL de mezcla de reacción a los pocillos que se van a utilizar.

b. Antes de pasar la placa al área de manipulación del ácido nucleico, añadir 10 µL de agua libre de nucleasa a los pocillos de NTC.

c. Aplicar sin sellar las tirillas de tapones ópticos o la cinta óptica a los bordes superiores de los pocillos de reacción y trasladar la placa al área de manipulación del ácido nucleico en hielo o bloque frío.

d. Retirar las tirillas de tapones ópticos o la cinta óptica y añadir 10 µL de ARN de muestra extraído a cada pocillo de muestra correspondiente. **Cambiar las puntas después de añadir cada muestra.**

e. Añadir 10 µL de control positivo de VDEN-1-4, control positivo de VCHIK, control positivo de VZIK y HSC (control positivo de RP) a pocillos separados, como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5: Ejemplo de la disposición de la placa de RCP-TR Trioplex para 3 muestras

Formato de la mezcla maestra

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Trioplex	Trioplex	Trioplex	Trioplex	Trioplex							
B	RP	RP	RP	RP	RP							
C												
D												
E												Trioplex
F												Trioplex
G												Trioplex
H												

Formato de la plantilla

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**M1**	**M2**	**M3**	**HSC**	**H2O NTC**							
B	**M1**	**M2**	**M3**	**HSC**	**H2O NTC**							
C												
D												
E												**CP DEL VDEN**
F												**CP DEL VCHIK**
G												**CP DEL VZIK**
H												

Controles positivos: E12-H12

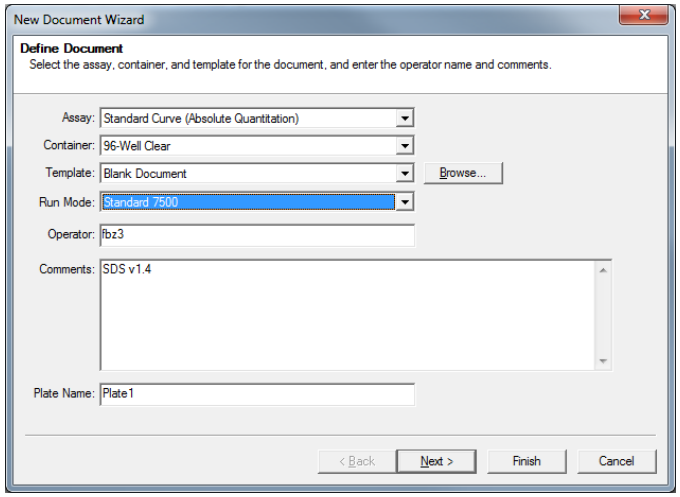
f. Sellar la placa con cinta o tapones ópticos y cargar la placa en el instrumento de RC en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx.

2. Ciclo de RCP

a. Iniciar el software ABI 7500 y seleccionar **Crear nuevo documento**.

b. Seleccionar **Standard 7500** en el menú Modo de funcionamiento y hacer clic en **Siguiente** (**Figura 3**).

Figura 3: Seleccionar modo de funcionamiento



c. Crear un nuevo detector para cada objetivo haciendo clic en **Nuevo detector** (**Figura 4**), nombrar VDEN, seleccionar el colorante activador **FAM** y establecer el colorante inhibidor como **ninguno** (**Figura 5**).

Figura 4: Seleccionar detector

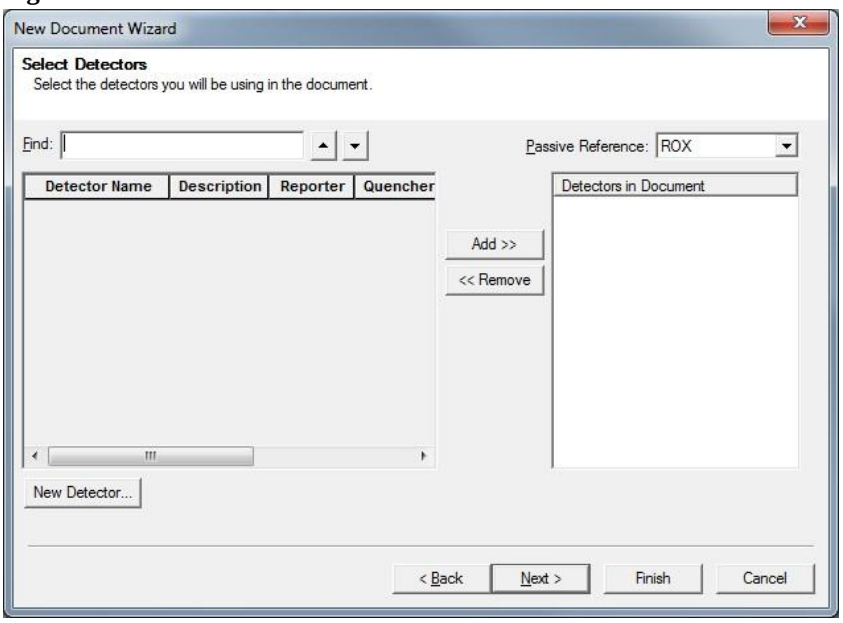
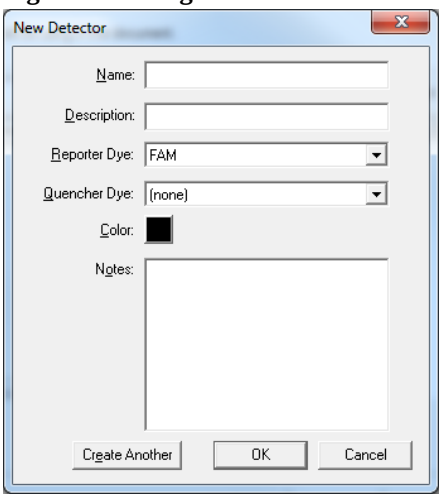
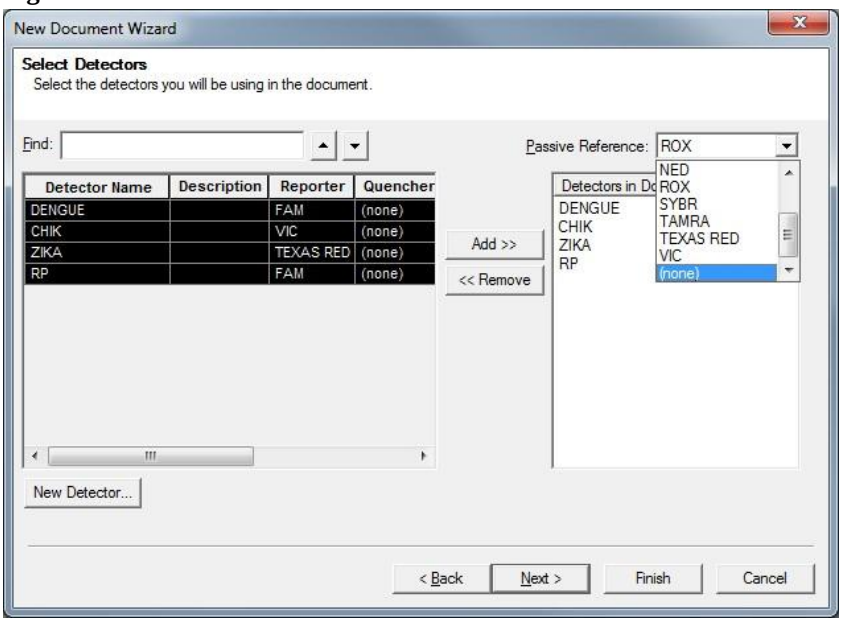


Figura 5: Configuraciones del activador e inhibidor



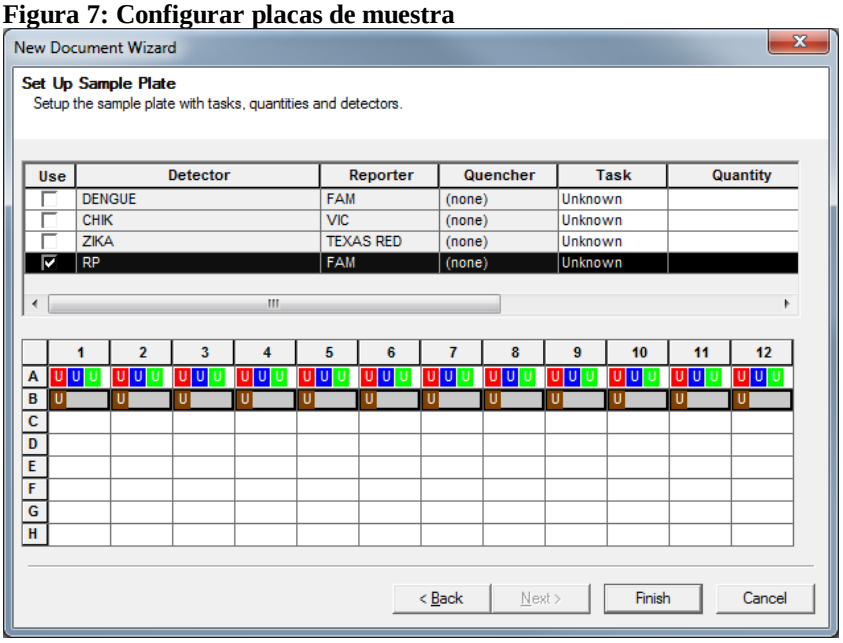
d. Repetir para el VCHIK, seleccionar el colorante activador **VIC** y dejar el colorante inhibidor como **ninguno**.
e. Repetir para el VZIK, seleccionar el colorante activador **Texas Red** y dejar el colorante inhibidor como **ninguno**.
f. Repetir para el RP, seleccionar el colorante activador **FAM** y dejar el colorante inhibidor como **ninguno**.
g. En la pantalla Seleccionar Detectores, seleccione **VDEN** y haga clic en **Añadir**.
h. Cambiar la Referencia Pasiva de **ROX** a **ninguno** (**Figura 6**).

Figure 6: Selección de Referencia Pasiva



i. En la pantalla Seleccionar Detectores, seleccione **VCHIK** y haga clic en **Añadir**.
j. Cambiar la Referencia Pasiva de **ROX** a **ninguno**.
k. En la pantalla Seleccionar Detectores, seleccione **VZIK** y haga clic en **Añadir**.
l. Cambiar la Referencia Pasiva de **ROX** a **ninguno**.
m. En la pantalla Seleccionar Detectores, seleccione **RP** y haga clic en **Añadir**.
n. Cambiar la Referencia Pasiva de **ROX** a **ninguno**.
o. En la ventana Configuración de la placa de muestra, señalar los pocillos correspondientes y seleccionar los detectores de **VDEN**, **VCHIK** y **VZIK** (**Figura 7**).

Figura 7: Configurar placas de muestra



p. Hacer doble clic en cada pocillo para ingresar el nombre de la muestra.

q. Seleccionar la pestaña Instrumento y definir las condiciones del termociclador, según la mezcla maestra utilizada:

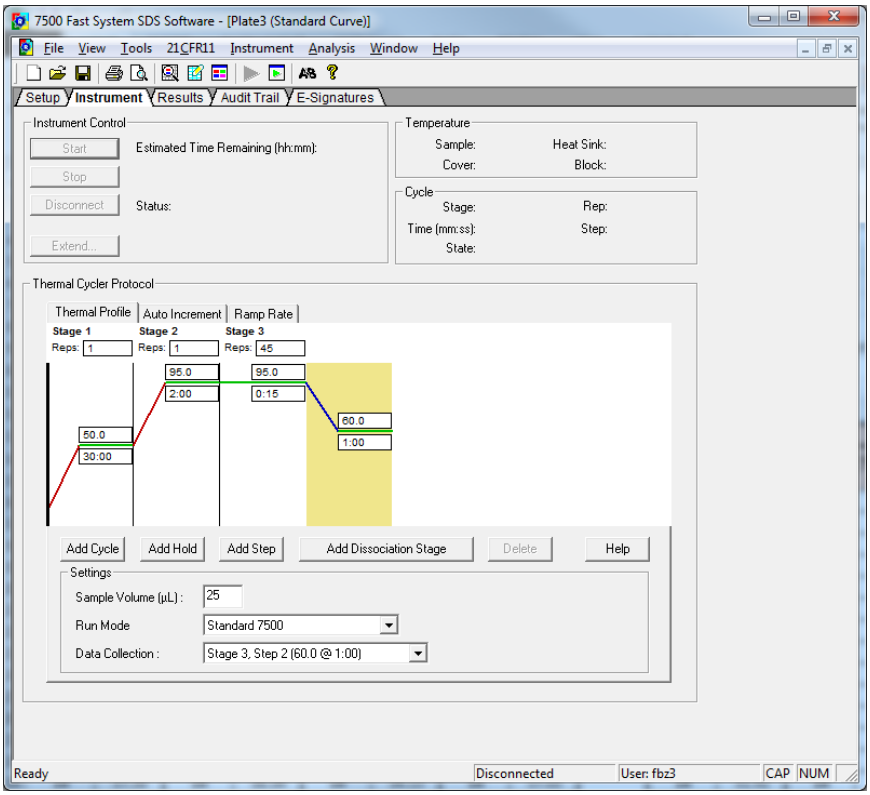
(1) Etapa 1: **30 min** a **50 °C**; **1 rep.**
(2) Etapa 2:
- SuperScript III: **2 min** a **95 °C**; **1 rep.**
- qScript: **5 min** a **95 °C**; **1 rep.**

(3) Etapa 3, paso 1: **15 seg** a **95 °C**
(4) Etapa 3, paso 2: **1 min** a **60 °C**
(5) Etapa 3: cambiar rep. a **45 ciclos** (**Figura 8**)

SuperScript III Condiciones del termociclador			
ETAPA 1	**ETAPA 2**	**ETAPA 3 PASO 1**	**ETAPA 3 PASO 2**
30 min	**2 min**	15 seg	1 min
50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
1 rep.	1 rep.		
		45 ciclos	

qScript One-Step Condiciones del termociclador			
ETAPA 1	**ETAPA 2**	**ETAPA 3 PASO 1**	**ETAPA 3 PASO 2**
30 min	**5 min**	15 seg	1 min
50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
1 rep.	1 rep.		
		45 ciclos	

Figura 8: Confirmar las condiciones del termociclador



(6) En **Configuraciones**, cambiar el volumen a **25 µL**

(7) En **Configuraciones**, **Modo de funcionamiento**, seleccionar **Standard 7500**

(8) La Etapa 3, paso 2, debe destacarse en amarillo para que indique la recolección de datos

r. Seleccionar **Guardar como**, designar el nombre del archivo y la carpeta

s. Hacer clic en **Iniciar**. El instrumento se iniciará y calculará el tiempo de funcionamiento.

Análisis de datos

Al finalizar el ciclo, guardar y analizar los datos según las instrucciones del fabricante del instrumento. Los análisis deben realizarse por separado para cada objetivo, usando una configuración de umbral manual. Los umbrales se deben ajustar para que se ubiquen al inicio de la fase exponencial de las curvas de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo. El procedimiento seleccionado para la configuración del umbral debe utilizarse coherentemente.

Interpretación de resultados de pruebas

Independientemente del tipo de espécimen que se analiza, preparar la mezcla de RCP como se indica en "Configuración de la placa de RCP".

DETERMINACIÓN DE LA VALIDEZ DE LA PRUEBA
Antes de poder determinar los resultados de cada espécimen clínico, el funcionamiento de la placa debe determinarse como **válido**. Para que una prueba se considere válida, los controles deben alcanzar los resultados esperados:

- Los controles de la prueba (ácido nucleico extraído de VDEN, VCHIK y VZIK inactivado) deben ser positivos y estar dentro del rango de valores C_T esperado. Si los controles de la prueba son negativos
  - Repetir la placa.
  - Si la repetición de la prueba genera un resultado negativo del control positivo, contactar el servicio de asistencia técnica de LRN para solicitar ayuda.
- Los NTC deben ser negativos. Si los NTC son positivos
  - Limpiar la posible contaminación del ADN de las superficies del banco y las pipetas en las áreas de trabajo de configuración del reactivo y adición de la plantilla.
  - Extraer y analizar múltiples NTC.
  - Descartar las diluciones de reactivos de trabajo y rehacerlos de estándares frescos.
  - Repetir las muestras solo para los objetivos que se amplificaron inadecuadamente.
- El HSC (control de la extracción) debe ser
  - Positivo con el set de cebador/sonda para RP, debido al ADN humano del HSC.
  - Negativo con los sets de cebador/sonda para virus. Un resultado positivo con cebador/sondas para HSC y virus indicaría que ha ocurrido una contaminación cruzada. Si se obtiene un resultado positivo, seguir el procedimiento de limpieza descrito anteriormente.

- La prueba de RP para cada espécimen debe ser **positiva**.
  - Si la prueba de RP para una muestra de espécimen es *negativa* y las pruebas de rRT-PCR Trioplex son todas *negativas* para las muestras de espécimen:
    i. Reportar el resultado como *No concluyente* a través del LRN Results Messenger
    ii. Seguir las instrucciones que aparecen a continuación:

Todos los tipos de	
1.	Repetir la prueba RCP-TR de la muestra usando la prueba de RP y Trioplex.
2.	Repetir la extracción de la alícuota del nuevo espécimen si la prueba de RP es *negativa* para los especímenes tras repetir la prueba.
3.	Luego de repetir la extracción y repetir la prueba de RCP-TR, si los VDEN, VCHIK y/o VZIK son *positivos*, considerar el resultado como verdadero *positivo* y continuar con el algoritmo de pruebas.
4.	Si no puede obtener los resultados para un espécimen de suero, analizar otros tubos de espécimen de suero del paciente, si están disponibles, o solicitar la recolección de suero adicional.

a. Si la prueba de RP para una muestra de espécimen es *negativa*, pero el resultado de VDEN, VCHIK y/o VZIK es *positivo* para las muestras de espécimen:
   - No repetir la prueba RCP-TR y considerar los resultados de la Trioplex RCP-TR válidos.

Si se han realizado todos los controles de forma adecuada, proceder a analizar cada objetivo.

NOTA: *La siguiente sección contiene figuras que se muestran como ejemplos genéricos. No son específicas de esta prueba.*

- Los verdaderos positivos deben producir curvas exponenciales con fases logarítmicas, lineales y mesetas (**Figura 9**).
  (Nota: Los moderadamente positivos producirán altos valores C_T que en ocasiones están desprovistos de una fase de meseta; sin embargo, se observará la curva exponencial.)

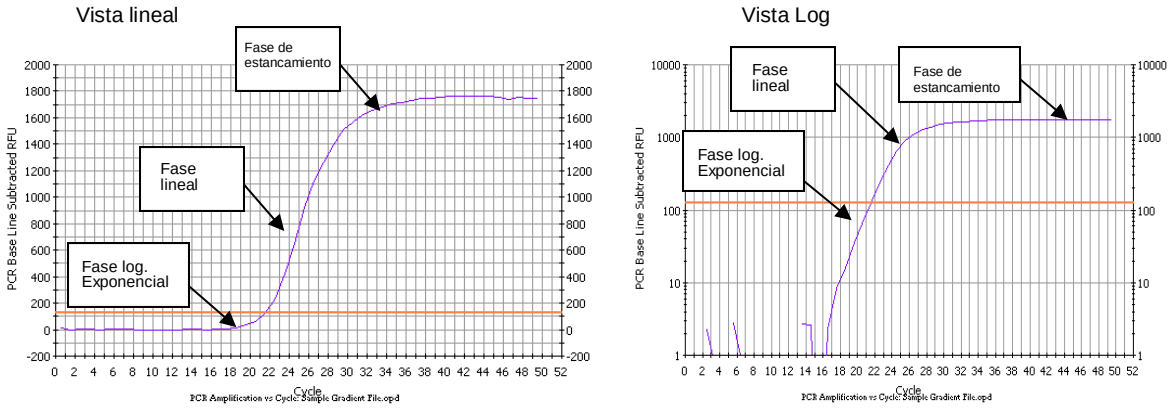


Figura 9: Las vistas log. y lineal de las curvas de RCP denotan cada etapa de los gráficos de amplificación.

- Para que una muestra sea verdadero positivo, la curva debe cruzar el umbral de forma similar a como se muestra en la **Figura 9**. NO debe cruzar el umbral y luego colocarse por debajo del umbral.
- La **Figura 10** muestra ejemplos de falsos positivos que no se amplifican exponencialmente.

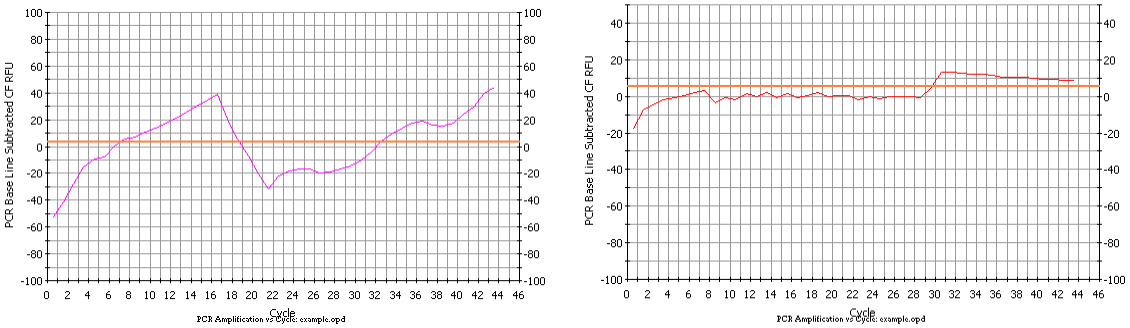


Figura 10: Ejemplos de curvas falsas positivas

- Para comprender mejor y evaluar las curvas difíciles con más eficacia, usar la vista de fluorescencia de fondo (Rn versus Ciclo con el software AB) para determinar si la curva es realmente positiva. En esta vista, un aumento marcado de la fluorescencia indica un verdadero positivo, mientras que una línea recta (o línea fluctuante) indica ausencia de amplificación.
  - La **Figura 11** muestra una curva con un valor de C_T de 29.2, aunque es evidente que la muestra es negativa al observar la vista de fluorescencia de fondo.
  - La **Figura 12** muestra un gráfico de amplificación con 3 curvas: un positivo relativamente débil con un C_T de 36.6 (negro), un positivo muy débil con un C_T de 42.1 (rojo) y un control negativo (azul). El débil positivo (CT= 42.1) se verifica para que sea positivo por un aumento marcado de la fluorescencia observado en la vista de fluorescencia de fondo.

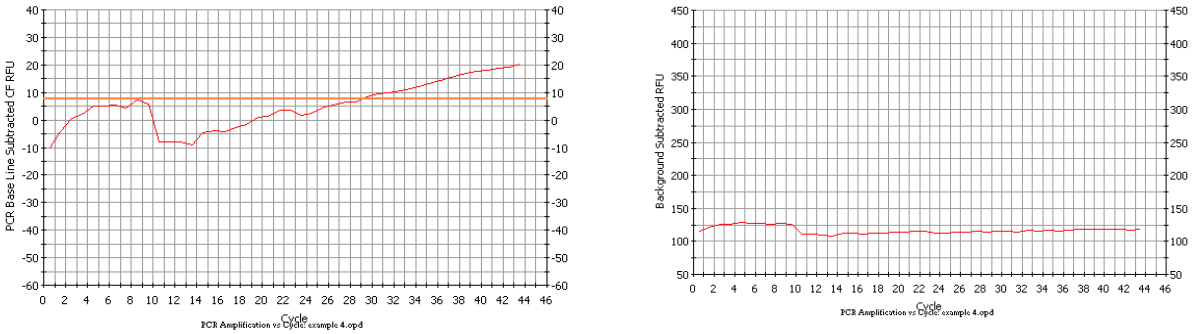


Figura 11: Gráfico de amplificación de una muestra con una curva "fluctuante" (izquierda) y la correspondiente vista de fluorescencia de fondo (derecha).

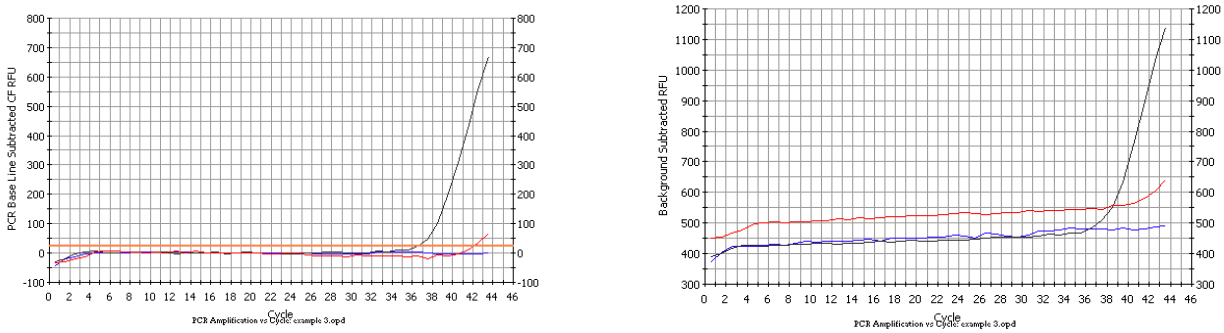


Figura 12: Gráfico de amplificación de tres muestras en la vista lineal (izquierda) y la correspondiente vista de fluorescencia de fondo (derecha).

- Nota sobre las muestras débiles positivas: Los positivos débiles deben <u>interpretarse siempre con cautela</u>. Observar detalladamente las curvas de fluorescencia asociadas a dichos resultados. Si las curvas son verdaderas curvas exponenciales, la reacción debe interpretarse como positiva.
    - Si es necesario repetir la prueba de un espécimen débil, es importante repetir la muestra en las réplicas ya que una ejecución de prueba repetida única tiene la posibilidad de generar un resultado inconsistente.
    - Si el espécimen se extrae y analiza nuevamente, puede ser de utilidad eluir en un volumen inferior para concentrar la muestra.
    - El servicio de asistencia técnica de LRN está disponible para ayudarle a determinar si se puede garantizar repetir la prueba y analizar otras estrategias de prueba, si corresponde.

INSTRUCCIONES PARA LA INTERPRETACIÓN E INFORME DE LOS ESPECÍMENES

Todos los controles de prueba deben examinarse antes de la interpretación de los resultados del paciente. Si los controles no son válidos, los resultados del paciente no pueden ser interpretados.

El resultado obtenido de un set de cebador y sonda se interpreta como positivo si la reacción genera una curva de crecimiento de fluorescencia que cruza el umbral en (<) 38 ciclos.

El resultado obtenido de un set de cebador y sonda se interpreta como negativo si:

- la reacción genera una curva de crecimiento de fluorescencia que cruza el umbral en, o por encima de, (≥) 38 ciclos, O
- la reacción no genera una curva de crecimiento de fluorescencia que cruza el umbral.

Tabla 6: Instrucciones para la interpretación e informe de Trioplex RCP-TR para los especímenes de suero y LCR

				Negativo	No se detectó ARN de zika, dengue o chikunguña mediante rRT-PCR.	Reportar los resultados a los CDC. No se requieren más pruebas. Nota: Si no se precisa la fecha de aparición de los síntomas o si el paciente está asintomático, se recomiendan las pruebas serológicas. Remitirse al algoritmo de los CDC.*
				No concluyente	Espécimen no concluyente para la presencia de ARN de zika, dengue y chikunguña mediante rRT-PCR. Puede aparecer un resultado no concluyente en el caso de un espécimen inadecuado.	Repetir extracción y RCP-TR. Si no puede solucionar el resultado no concluyente para un espécimen de suero, solicitar la recolección de suero adicional del paciente. Reportar los resultados no concluyentes a los CDC.
				Positivo para VDEN, pero negativo para VZIK y VCHIK.	ARN del dengue detectado mediante RCP-TR. No se detectó ARN de zika o chikunguña.	Informar los resultados a los CDC. Enviar espécimen a los CDC. Remitirse al algoritmo de los CDC.*
				Positivo para VCHIK, pero negativo para VZIK y VDEN.	Se detectó ARN de chikunguña mediante RCP-TR. No se detectó ARN de dengue o zika.	
				Positivo para VZIK, pero negativo para VDEN y VCHIK.	ARN del zika detectado mediante RCP-TR. No se detectó ARN de dengue o chikunguña.	
				Positivo para VDEN y VCHIK, pero negativo para VZIK.	Se detectó ARN de dengue y chikunguña mediante RCP-TR. No se detectó ARN de zika.	
				Positivo para VZIK y VDEN, pero negativo para VCHIK	Se detectó ARN de zika y dengue mediante RCP-TR.	
				Positivo para VZIK y VCHIK, pero negativo para VDEN	Se detectó ARN de zika y chikunguña mediante RCP-TR. No se detectó ARN de dengue.	
				Positivo para VZIK, VDEN y VCHIK	Se detectó ARN de zika, dengue y chikunguña mediante RCP-TR.	

* Las directrices del laboratorio emitidas por los CDC y sus algoritmos de pruebas para el zika están disponibles en el sitio web de los CDC: http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html

Si tiene especímenes positivos para enviar a los CDC, notifique al Servicio de Asistencia Técnica de LRN (LRN@cdc.gov) y solicite instrucciones para el envío de especímenes.

Tabla 7: Instrucciones para la interpretación e informe de Trioplex RCP-TR para los especímenes de orina y líquido amniótico

VZIK	RP	Interpretación	Informe	Medidas
-	+	Negativo	No se detectó ARN de zika mediante RCP-TR.	Informar los resultados a los CDC. Remitirse al algoritmo de los CDC.*
-	-	No concluyente	Espécimen no concluyente para la presencia de ARN de zika mediante RCP-TR. Puede aparecer un resultado no concluyente en el caso de un espécimen inadecuado.	Repetir extracción y RCP-TR. Si al repetir la prueba no se resuelve el resultado no concluyente, no se debe continuar con la prueba. Informar los resultados a los CDC.
+	+/-	Positivo	Se detectó ARN del zika mediante RCP-TR.	Reportar los resultados a los CDC. Enviar espécimen a los CDC. Remitirse al algoritmo de los CDC.*

*Las directrices del laboratorio emitidas por los CDC y sus algoritmos de pruebas para el zika se pueden encontrar en el sitio web de los CDC: http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html

Si usted tiene especímenes positivos para enviar a los CDC, notifique al Servicio de Asistencia Técnica de LRN (LRN@cdc.gov) y solicite instrucciones para el envío de especímenes.

NOTA: Todos los resultados de la prueba que se obtengan mediante la Trioplex RCP-TR de los laboratorios de la LRN deben enviarse a los CDC a través de LRN Results Messenger. Consulte la Política de mensajería de datos de la LRN (que se encuentra en «Documents/LRN Specific Information/LRN Policy Statements» en el sitio web de la LRN). Si tiene preguntas acerca de esta política, comuníquese con el Servicio de asistencia técnica de la LRN en LRN@cdc.gov.

Los resultados positivos también se pueden reportar a través de ArboNet.

NOTA: Consulte la sección **Interpretación de resultados de pruebas** para obtener directrices detalladas sobre la interpretación de resultados débiles positivos o curvas cuestionables.

Limitaciones de la prueba

La interpretación de los resultados de la prueba RCP-TR debe tener en cuenta la posibilidad de resultados falsos negativos y falsos positivos. Los resultados falsos negativos pueden surgir de:

- recolección de muestras deficiente, o
- degradación de los ARN virales durante el envío o almacenamiento, o
- recolección de especímenes llevada a cabo antes de la aparición de los síntomas
- recolección de especímenes luego de que el ácido nucleico no se pueda hallar en el paciente (aproximadamente 7 días después de la aparición de síntomas en el análisis de sueros)
- no haber seguido los procedimientos de prueba autorizados
- no haber usado el kit y la plataforma de extracción autorizados

La aplicación de controles de prueba adecuados que identifiquen los especímenes de mala calidad (como RNasa P) y el cumplimiento de las directrices de los CDC para las pruebas de VDEN, VCHIK y VZIK pueden ayudar a evitar la mayoría de los resultados falsos negativos.

La causa más habitual de resultados falsos negativos es la contaminación con ADN previamente amplificado. El uso liberal de muestras de control negativas en cada prueba puede ayudar a garantizar que se detecte la contaminación en laboratorios y que los resultados falsos negativos no se reporten.

Los resultados negativos no descartan la infección por el virus del Zika y no deben utilizarse como base única para la decisión de manejo/tratamiento de un paciente. Todos los resultados deben ser interpretados por un profesional capacitado junto con la revisión del historial y los signos y síntomas del paciente.

Esta prueba es para el uso diagnóstico *in vitro* bajo la Autorización de Uso de Emergencia de la FDA únicamente, y está limitada a laboratorios cualificados designados por los CDC.

Todos los especímenes deben ser manipulados como si fueran infecciosos. Se deben emplear las precauciones de bioseguridad apropiadas, incluyendo un equipo de protección personal, cuando se manipulen los materiales de espécimen. Se puede encontrar más información sobre la manipulación segura de especímenes de virus del Zika en: http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html.

Una toma de muestra correcta, el almacenamiento y el transporte apropiados de los especímenes son fundamentales para obtener resultados correctos.

La extracción de ácido nucleico de las muestras clínicas se debe realizar con los métodos de extracción específicos indicados en este procedimiento. No se han evaluado otros métodos de extracción para su uso en esta prueba.

El desempeño solo se ha establecido con los tipos de muestras que se enumeran en el Uso previsto. No se han evaluado otros tipos de especímenes.

Características de desempeño

Límite de detección

Los límites de detección (LoD, por sus siglas en inglés) para la Trioplex RCP-TR se establecieron y volvieron a verificar en una gran cantidad de estudios. Los resultados de dichos límites se resumen en la Tabla 8. Los estudios de los LoD llevados a cabo con el Instrumento MagNA Pure LC 2.0 (MP LC 2.0) y SuperScript III (SS III) se analizan en las Secciones 1.a. – 1.c. En la Sección 4 se analizan otros estudios de apoyo.

Tabla 8: Resumen general de datos del límite de detección

	Extracción	Mezcla maestra	VZIK (GCE/mL)	VDEN (GCE/mL)	VCHIK (GCE/mL)
Suero	MP LC 2.0	SS III	1.54×10^4	2.15×10^4	3.99×10^5
	QIAamp	SS III	1.51×10^4		
	MP 96	SS III	1.95×10^4	1.48×10^4	3.79×10^5
	MP LC 2.0	qScript	3.11×10^4	3.86×10^4	8.05×10^5
Orina	MP LC 2.0	SSIII	1.79×10^4		
	QIAamp	SS III	2.15×10^4		
	MP 96	SS III	1.77×10^4		
	MP LC 2.0	qScript	4.20×10^4		

GCE = equivalente de copia de genoma
MP 96 = Instrumento de extracción MagNA Pure 96

1. LoD del VZIK
   El límite de detección del set de cebador y sonda de VZIK se evaluó tanto en suero humano normal y en orina usando la cepa del brote de la Polinesia Francesa 2013 del virus del Zika. Se prepararon cinco diluciones en serie de 10 pliegues en cada matriz. Para cada matriz, se extrajo cada concentración 20 veces usando el instrumento MagNA Pure LC 2.0 y se probó mediante la Trioplex RCP-TR usando la mezcla maestra SuperScript III. Los resultados de suero se resumen en la Tabla 9. Los resultados de la orina se indican en la Tabla 10.

Tabla 9: LoD del VZIK en suero

Dilución	GCE/mL	VZIK # positivo	C_T promedio	VDEN # positivo	VCHIK # positivo
1	1.93×10^7	20/20	28.10	0/20	0/20
2	1.25×10^6	20/20	31.58	0/20	0/20
3	9.62×10^4	20/20	34.84	0/20	0/20
4	1.54×10^4	20/20	37.17	0/20	0/20
5	1.54×10^3*	0/20	NC	0/20	0/20

* Con base en concentración de dilución 4. Ante la ausencia de resultados positivos en esta concentración, la cuantificación para esta dilución no se podría determinar usando la curva estándar.
ND = No detectado

Tabla 10: LoD del VZIK en orina

Dilución	GCE/mL	VZIK # positivo	C_T promedio	VDEN # positivo	VCHIK # positivo
1	5.38×10^7	20/20	26.8	0/20	0/20
2	4.25×10^6	20/20	30.03	0/20	0/20
3	2.75×10^5	20/20	33.51	0/20	0/20
4	1.79×10^4	19/20	36.98	0/20	0/20
5	1.79×10^3*	0/20	NC	0/20	0/20

* Con base en concentración de dilución 4. Ante la ausencia de resultados positivos en esta concentración, la cuantificación para esta dilución no se podría determinar usando la curva estándar.
ND = No detectado

2. LoD del VDEN

El límite de detección del set de cebador y sonda de VDEN se evaluó en suero humano normal usando una cepa representativa de cada serotipo del virus del dengue (VDEN-1 Puerto Rico 1998, VDEN-2 Puerto Rico 1998, VDEN-3 Puerto Rico 2004, VDEN-4 Puerto Rico 1998). Se prepararon cinco diluciones en serie de 10 pliegues de cada cepa en cada matriz. Para cada matriz, se extrajo cada concentración 20 veces usando el instrumento MagNA Pure LC 2.0 y se probó mediante la Trioplex RCP-TR usando la mezcla maestra SuperScript III. Los resultados se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11: LoD del VDEN en suero

Dilución		GCE/mL	VDEN # positivo	C_T promedio	VZIK # positivo	VCHIK # positivo
Serotipo 1	1	5.82×10^5	20/20	32.55	0/20	0/20
	2	2.15×10^4	20/20	36.75	0/20	0/20
	3	3.44×10^3	1/20	39.08	0/20	0/20
	4	3.80×10^2	0/20	41.88	0/20	0/20
	5	38 *	0/20	NC	0/20	0/20
Serotipo 2	1	8.25×10^6	20/20	29.18	0/20	0/20
	2	7.87×10^5	20/20	32.17	0/20	0/20
	3	1.72×10^4	19/20	37.03	0/20	0/20
	4	3.85×10^3	0/20	38.94	0/20	0/20
	5	3.85×10^2 *	0/20	NC	0/20	0/20
Serotipo 3	1	4.36×10^6	20/20	29.99	0/20	0/20
	2	2.67×10^5	20/20	33.54	0/20	0/20
	3	1.66×10^4	20/20	37.07	0/20	0/20
	4	1.99×10^3	0/20	39.78	0/20	0/20
	5	1.99×10^2 *	0/20	NC	0/20	0/20
Serotipo 4	1	2.68×10^6	20/20	30.61	0/20	0/20
	2	2.08×10^5	20/20	33.86	0/20	0/20
	3	1.36×10^4	19/20	37.33	0/20	0/20
	4	2.56×10^3	1/20	39.46	0/20	0/20
	5	2.56×10^2 *	0/20	NC	0/20	0/20

* Con base en concentración de dilución 4. Ante la ausencia de resultados positivos en esta concentración, la cuantificación para esta dilución no se podría determinar usando la curva estándar.
ND = No detectado

3. LoD del VCHIK
   El límite de detección del set de cebador y sonda de VCHIK se evaluó en suero humano normal usando la cepa del brote de Puerto Rico 2014 del virus del chikunguña. Se prepararon cinco diluciones en serie de 10 pliegues en cada matriz. Para cada matriz, se extrajo cada concentración 20 veces usando el instrumento MagNA Pure LC 2.0 y se probó mediante la Trioplex RCP-TR usando la mezcla maestra SuperScript III. Los resultados del suero se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12: LoD del VCHIK en suero

Dilución	GCE/mL	VCHIK # positivo	C_T promedio	VZIK # positivo	VDEN # positivo
1	1.28×10^7	20/20	31.95	0/20	0/20
2	1.30×10^6	20/20	35.42	0/20	0/20
3	3.99×10^5	19/20	37.22	0/20	0/20
4	2.01×10^5	2/20	38.26	0/20	0/20
5	2.01×10^4 *	0/20	NC	0/20	0/20

* Con base en concentración de dilución 4. Ante la ausencia de resultados positivos en esta concentración, la cuantificación para esta dilución no se podría determinar usando la curva estándar.
ND = No detectado

Inclusión

1. Evaluación de inclusión del VDEN
   La inclusión del set de cebador y sonda de VDEN se evaluó mediante el uso de un panel de ARN de 29 muestras aisladas internacionales, que representaban cepas contemporáneas de todos los genotipos relevantes desde el punto de vista clínico. La prueba se realizó mediante el uso de la mezcla maestra SuperScript III. Los resultados de la prueba se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13: Inclusión del VDEN en los virus del dengue

Serotipo del virus del dengue	Cepas analizadas	Resultados positivos de VDEN
1	6	100 %
2	11	100 %
3	6	100 %
4	6	100 %

2. Análisis de secuencias de VZIK, VDEN y VCHIK
   El análisis *in silico* de secuencias de cebadores y sondas de la Trioplex RCP-TR se realizó a fin de verificar la homología de secuencias de reactivos con cada virus y región objetivo correspondientes. Para este estudio, se seleccionó un total de 514 cepas del virus del dengue históricas y actuales, entre ellas, 104 VDEN-1, 142 VDEN-2, 154 VDEN-3 y 114 VDEN-4, 206 cepas del virus del chikunguña y 33 cepas del virus del Zika. Todas las secuencias de cebadores y sondas mostraron 100 % de identidad de secuencia con su objetivo esperado, lo cual predijo que no existe la posibilidad de que haya resultados falsos negativos. La Tabla 14 a continuación muestra un resumen de estos hallazgos.

Tabla 14: Análisis de inclusión *in silico*

			Identidad de secuencia cebador/sonda									
Virus	**Cepa**	**N.° de GenBank**	**VDEN-F**	**VDEN-R1**	**VDEN-R2**	**VDEN-P**	**VCHIK-F**	**VCHIK-R**	**VCHIK-P**	**VZIK-F**	**VZIK-R**	**VZIK-P**
VDEN-1	México 2012	KJ189368	100 %	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-1	Nicaragua 2011	KF973453	100 %	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-1	Brasil 2010	JX669466	100 %	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-1	Arabia Saudita 2011	KJ649286	100%	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-1	Tailandia 2013	KF887994	100%	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-2	Perú 2011	KC294210	100%	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-2	Brasil 2010	JX669477	100%	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-2	Indonesia 2010	KC762679	100%	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-2	Arabia Saudita 2014	KJ830750	100%	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-2	Singapur 2012	KM279577	100%	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-3	Nicaragua 2009	JF937631	100%	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-3	Indonesia 2010	KC762693	100%	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-3	China 2013	KJ622195	100%	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-3	Tailandia 2010	HG316483	100%	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-3	Brasil 2009	JF808120	100%	100 %	<85 %	100 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-4	Venezuela 2007	HQ332174	100%	<85 %	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-4	Brasil 2010	JN983813	100%	<85 %	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-4	Paquistán 2009	KF041260	100%	<85 %	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-4	Singapur 2005	GQ398256	100%	<85 %	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VDEN-4	Camboya 2008	JN638570	100%	<85 %	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	El Salvador 2014	KR559471	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	Jamaica 2014	KR559489	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	Trinidad y Tobago 2014	KR046231	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	Polinesia Francesa 2015	KR559473	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	Brasil 2014	KR264951	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	Guyana 2014	KR559496	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %

			Identidad de secuencia cebador/sonda									
Virus	**Cepa**	**N.° de GenBank**	**VDEN-F**	**VDEN-R1**	**VDEN-R2**	**VDEN-P**	**VCHIK-F**	**VCHIK-R**	**VCHIK-P**	**VZIK-F**	**VZIK-R**	**VZIK-P**
VCHIK	Tailandia 2013	KJ579186	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	India 2013	KT336782	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	Indonesia 2013	KM673291	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	China 2012	KC488650	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	Filipinas 2013	AB860301	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	Rep. del Congo 2011	KP003813	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	Singapur 2008	FJ445463	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	Sri Lanka 2008	FJ513654	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	China 2008	GU199351	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	Malasia 2008	FJ807899	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	India 2008	JN558835	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	México 2014	KP851709	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	Puerto Rico 2014	KR559474	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VCHIK	Honduras 2014	KR559488	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%	<20 %	<20 %	<20 %
VZIK	China 2016	KU740184	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%
VZIK	Brasil 2015	KU527068	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%
VZIK	Guatemala 2015	KU501217	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%
VZIK	Brasil 2015	KU365778	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%
VZIK	Polinesia Francesa 2013	KJ776791	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%
VZIK	Surinam 2015	KU312312	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%
VZIK	Puerto Rico 2015	KU501215	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%
VZIK	Tailandia 2014	KU681081	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%
VZIK	Filipinas 2012	KU681082	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%
VZIK	Isla de Martinica 2015	KU647676	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%
VZIK	Micronesia 2007	EU545988	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%
VZIK	Haití 2014	KU509998	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%
VZIK	China 2016	KU744693	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100%
VIK	Brasil 2015	KU321639	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	<20 %	100%	100%	100 %

Exclusividad

1. Evaluación de exclusividad de afines cercanos
   Se analizó ampliamente la evaluación de la reactividad cruzada de cada componente de la Trioplex RCP-TR con los virus afectados por los otros componentes, como parte del LoD, el puente y las evaluaciones de los especímenes artificiales. No se observó reactividad cruzada entre los cebadores y las sondas de los componentes y estos tres virus.

   Se seleccionaron tres flavivirus adicionales (VNO, VFA y VESL) para evaluar la especificidad de los sets de cebadores y sondas del VDEN, VZIK Y VCHIK. Se extrajo el sobrenadante de los cultivos de tejido del VNO (cepa NY99), VFA (cepa 17D), y VESL (cepa MSI-7) mediante el instrumento MagNA Pure LC 2.0 de Roche y se analizó utilizando la mezcla maestra SuperScript III. Los tres virus se analizaron por duplicado en 3 diluciones de 10 veces. No se observó reactividad cruzada. Todos los controles se realizaron según lo previsto.

Tabla 15: Reactividad cruzada cercana

Virus	Cepa	Resultado del VZIK	Resultado de VDEN	Resultado de VCHIK
Virus del Nilo Occidental	NY99	No hay reactividad cruzada	No hay reactividad cruzada	No hay reactividad cruzada
Virus de la fiebre amarilla	17D	No hay reactividad cruzada	No hay reactividad cruzada	No hay reactividad cruzada
Virus de encefalitis de San Luis	MSI-7	No hay reactividad cruzada	No hay reactividad cruzada	No hay reactividad cruzada
Virus del Zika*	Polinesia Francesa 2013	n/c	No hay reactividad cruzada	No hay reactividad cruzada
Virus del dengue*	Representantes de los 4 serotipos	No hay reactividad cruzada	n/c	No hay reactividad cruzada
Virus del chikunguña*	Puerto Rico	No hay reactividad cruzada	No hay reactividad cruzada	n/c

*Los resultados de la reactividad cruzada para estos tres virus se extrapolaron de los datos presentados en el límite de detección, el puente, las evaluaciones de los especímenes clínicos y artificiales archivados.

2. Evaluación de exclusión no arboviral
   Algunos virus y organismos conocidos por provocar signos y síntomas similares a los de los virus detectados mediante la Trioplex RCP-TR fueron seleccionados para formar parte de la evaluación de exclusión. Se preparó el ácido nucleico de estándares cuantificados de cepas calificadas de cada uno de los organismos enumerados. Todos los organismos se analizaron por triplicado a una concentración alta: 100 pg de ácido nucleico/reacción No se observó reactividad cruzada. Todos los controles se realizaron según lo previsto.

Tabla 16: Reactividad cruzada no arboviral

Organismo		Concentración	Número positivo		
			VZIK	VDEN	VCHIK
Bacterias	*Borrelia burgdorferi*	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
Hongo	*Histoplasma*	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
Protozoos	*Plasmodium falciparum*	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
Virus	Citomegalovirus	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
	VHS-1	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
	Influenza A	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
	Influenza B	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
	VVZ	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
	Vaccinia	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
	Adenovirus	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3

3. Evaluación *in silico*
   La evaluación adicional de la especificidad analítica de la Trioplex RCP-TR se realizó mediante el análisis *in silico* de cada secuencia de cebadores y sondas, con respecto a otras causas comunes de cuadro febril agudo en seres humanos. Las búsquedas del análisis BLAST de los cebadores y sondas de la Trioplex RCP-TR se realizaron con respecto a las secuencias de nucleótidos de dominio público GenBank y no mostraron homologías combinadas significativas (cebador diana y sonda diana) con otras enfermedades que pudieran predecir posibles resultados de RCP-TR falsos positivos. Las enfermedades y agentes causales asociados que abarca el análisis de especificidad *in silico* se muestranTable 17.

Tabla 17: Organismos evaluados durante el análisis de especificidad *in silico*

Organismo		Organismo (taxid.)
Bacterias	*Borrelia burgdorferi*	64895
	Estreptococos del grupo A	36470
	Salmonella spp.	590
	Leptospira spp.	171
	Rickettsia spp.	780
Tremátodos	*Schistosoma spp.*	6181
Hongo	*Histoplasma spp.*	5036

Protozoos	*Plasmodium falciparum*	5833
	Organismo	**Organismo**
	Trypanosoma cruzi	5693
Flavivirus	Zika (VDEN y VCHIK)	64320
	Dengue (VZIK y VCHIK)	11052
	VNO	11082
	VFA	40005
	VESL	11080
	Virus Spondweni	64318
	JEEV	11071
Alfavirus	Chikunguña (VZIK y VDEN)	37124
	EEEV	11021
	VEEO	11039
	Virus del río Ross	11029
	Virus del bosque Barmah	11020
	Virus O'nyong-nyong	11027
	Virus Mayaro	59301
Otros virus	Parvovirus (B19)	10789
	Virus del sarampión	11234
	Virus de la rubéola	11041
	Citomegalovirus	10358
	VHS-1	10298
	VHS-2	10310
	Influenza A	11320
	Influenza B	11520
	VZV	10335
	Vaccinia	10245
	Virus Epstein Barr	10376
	VIH	11676
	Hepatitis C	11102
	Enterovirus	12059
	Adenovirus	108098
		130310
		129951
		565302
		10519

Estudios comparativos

1. Evaluaciones de las mezclas maestras qScript y SuperScript III:
   Se prepararon cuatro mezclas del material para su evaluación: tres mezclas de suero y una de orina. En una mezcla de suero y una mezcla de orina se agregó una cepa del virus del

Zika de 2013 de la Polinesia Francesa en el factor de dilución del estándar viral identificado como el LoD para el VZIK mediante el SuperScript III. En una mezcla de suero se agregó el virus del dengue (Puerto Rico, 1998, estereotipo 2) en el factor de dilución del estándar viral identificado como el LoD para el VDEN mediante el SuperScript III. Y una mezcla de sueros se agregó al virus del chikunguña (Puerto Rico, 2014) en el factor de dilución del estándar viral identificado como el LoD para el VCHIK mediante el SuperScript III.

Cada mezcla se extrajo utilizando el Instrumento MagNA Pure LC 2.0, 20 veces. Cada muestra de ARN resultante se analizó mediante la Trioplex RCP-TR, utilizando la mezcla maestra SuperScript III y la mezcla maestra qScript. Los resultados muestran un desempeño comparable entre las mezclas maestras SuperScript III y qScript. Se incluyó una curva estándar en el análisis de cada mezcla maestra. Ambas mezclas maestras se aceptan para su uso en la prueba. El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 18 y en la Tabla 19.

Tabla 18: Resumen comparativo del qScript del VZIK

	VZIK			
	Suero		**Orina**	
	SuperScript III	**qScript**	**SuperScript III**	**qScript**
C_T	36.52	36.28	36.87	35.90
Desv. est.	1.26	0.58	0.96	0.65
Positivo	20/20	20/20	20/20	20/20
GCE/mL	**2.57×10^4**	**3.11×10^4**	**1.95×10^4**	**4.20×10^4**

Tabla 19: Resumen comparativo del qScript de VDEN y VCHIK

	VDEN-2		**VCHIK**	
	Suero		**Suero**	
	SuperScript III	**qScript**	**SuperScript III**	**qScript**
C_T	36.66	36.00	37.35	36.15
Desv. est.	0.95	0.58	0.44	0.39
Positivo	20/20	20/20	19/20	20/20
GCE/mL	**2.30×10^4**	**3.86×10^4**	**3.67×10^5**	**8.05×10^5**

2. Evaluación de la extracción con instrumento MagNA Pure 96
   Este estudio representó una repetición del estudio del LoD inicial (Sección M.1.) con el instrumento MagNA Pure 96. La única diferencia es que se seleccionó un solo virus del dengue (Puerto Rico, 2004, estereotipo 3) para esta evaluación, en lugar de llevar a cabo la evaluación en los cuatro serotipos. Los resultados de la evaluación LoD para el VZIK se resumenen la Tabla 20 y en la Tabla 21. Los resultados para el VDEN se resumen en la Tabla 22; los resultados para el VCHIK se resumen en la Tabla 23. El MagNA Pure 96 se acepta para su uso en la prueba.

Tabla 20: Evaluación con instrumento MagNA Pure 96 – zika en suero

Dilución	GCE/mL	VZIK # positivo	C_T promedio	VDEN # positivo	VCHIK # positivo
1	2.71×10^6	20/20	30.60	0/20	0/20
2	2.94×10^5	20/20	33.42	0/20	0/20
3	1.95×10^4	19/20	36.87	0/20	0/20
4	6.36×10^3	2/20	38.30	0/20	0/20
5	6.36×10^2 *	0/20	NC	0/20	0/20

* Con base en concentración de dilución 4. Ante la ausencia de resultados positivos en esta concentración, la cuantificación para esta dilución no se podría determinar usando la curva estándar.
ND = No detectado

Tabla 21: Evaluación con instrumento MagNA Pure 96 – zika en orina

Dilución	GCE/mL	VZIK # positivo	C_T promedio	VDEN # positivo	VCHIK # positivo
1	4.40×10^7	20/20	27.05	0/20	0/20
2	3.50×10^6	20/20	30.27	0/20	0/20
3	2.64×10^5	20/20	33.56	0/20	0/20
4	1.77×10^4	19/20	37	0/20	0/20
5	1.77×10^3 *	0/20	NC	0/20	0/20

* Con base en concentración de dilución 4. Ante la ausencia de resultados positivos en esta concentración, la cuantificación para esta dilución no se podría determinar usando la curva estándar.
ND = No detectado

Tabla 22: Evaluación con instrumento MagNA Pure 96 – dengue en suero

Dilución	GCE/mL	VDEN # positivo	C_T promedio	VZIK # positivo	VCHIK # positivo
1	1.43×10^5	20/20	34.34	0/20	0/20
2	1.48×10^4	19/20	37.23	0/20	0/20
3	1.53×10^3	0/20	40.11	0/20	0/20
4	1.53×10^2 *	0/20	NC	0/20	0/20
5	15.3 *	0/20	NC	0/20	0/20

* Con base en concentración de dilución 3. Ante la ausencia de resultados positivos en esta concentración, la cuantificación para esta dilución no se podría determinar usando la curva estándar.
ND = No detectado

Tabla 23: Evaluación con instrumento MagNA Pure LC 96 - chikunguña en suero

Dilución	GCE/mL	CHIK # positivo	C_T promedio	VDEN # positivo	VZIK # positivo
1	1.82×10^6	20/20	34.91	0/20	0/20
2	3.79×10^5	19/20	37.29	0/20	0/20
3	1.50×10^5	0/20	38.70	0/20	0/20
4	1.50×10^4 *	0/20	NC	0/20	0/20
5	1.50×10^3 *	0/20	NC	0/20	0/20

* Con base en concentración de dilución 3. Ante la ausencia de resultados positivos en esta concentración, la cuantificación para esta dilución no se podría determinar usando la curva estándar.
ND = No detectado

3. Evaluación mediante extracción con QIAamp
Se añadió un grupo de muestras de orina y uno de suero mediante el uso de la cepa Polinesia Francesa 2013 del virus del Zika al factor de dilución de la existencia de virales identificados como LoD para VZIK con el instrumento MagNA Pure LC 2.0. Cada grupo se extrajo 20 veces usando el Mini-kit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp y se probó mediante la Trioplex RCP-TR usando la mezcla maestra SuperScript III. Los resultados muestran que el Minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp se desempeña de una manera no inferior al instrumento MagNA Pure LC 2.0 en la preparación de ácido nucleico para pruebas subsiguientes mediante la Trioplex RCP-TR y su uso es aceptable en esta prueba.

Tabla 24: Resumen de apoyo de la evaluación mediante extracción con QIAamp

Matriz	Virus del Zika GCE/mL	VZIK # positivo	C_T promedio	VDEN # positivo	VCHIK # positivo
Suero	1.51×10^4	19/20	37.20	0/20	0/20
Orina	2.15×10^4	19/20	36.75	0/20	0/20

Evaluación clínica

1. Desempeño clínico de la Trioplex RCP-TR
De la colección de archivos de la Sucursal de Dengue de los CDC en Puerto Rico, se seleccionaron 130 especímenes de suero para evaluar el desempeño de la Trioplex RCP-TR. Se incluyeron cuarenta y ocho (48) especímenes de casos de dengue (12 de cada serotipo), 12 de casos de chikunguña, 20 de casos de zika y 50 especímenes negativos de personas sintomáticas en este conjunto de especímenes. Luego de retirados del archivo (-70 ^oC), los especímenes fueron sometidos a pruebas con la Trioplex RCP-TR (mediante el uso de SuperScript III y el instrumento MagNA Pure LC 2.0), la prueba rRT-PCR 1-4 para VDEN, la prueba singleplex NS3 para el zika, desarrollada y validada en el laboratorio y la prueba rRT-PCR nSP1 para chikunguña aprobadas por la FDA. Los resultados de las pruebas con RCP-TR 1-4 para VDEN y las pruebas RCP-TR en el laboratorio para zika y chikunguña coincidieron con la determinación anterior asociada con todos, excepto uno, de los especímenes del depósito.
Un espécimen de Zika archivado generó resultados negativos con la prueba NS3 para el zika desarrollada en el laboratorio (C_T 38.45, corte positivo de la prueba <38) y resultados positivos para el zika con la Trioplex RCP-TR. Debido al resultado obtenido con la prueba NS3 para el zika desarrollada en el laboratorio, el espécimen de zika archivado fue reclasificado como espécimen negativo y el resultado de la Trioplex se analizó como falso

positivo. Los resultados de la prueba Trioplex RCP-TR se compararon con la categoría de especímenes archivados en la tabla a continuación.

Tabla 25: Desempeño de la Trioplex RCP-TR con especímenes clínicos archivados

Categoría de espécimen	Analizados	Resultado del componente Trioplex		
		Positivo para VZIK	**Positivo para VDEN**	**Positivo para VCHIK**
Zika	19*	19/19	0/19	0/19
Dengue	48	0/48	47/48**	0/48
Chikunguña	12	0/12	0/12	12/12
Negativo	51*	2/51	0/51	1/51
Acuerdo porcentual positivo		**100 %** (19/19) 95 % CI: 83.2 % - 100 %)	**97.9 %** (47/48) 95 % CI: 89.1 % - 99.6 %	**100 %** (12/12) 95 % CI: 75.8 % - 100 %
Acuerdo porcentual negativo		**98.2 %** (109/111) 95 % CI: 93.7 % - 99.5 %	**100 %** (82/82) 95 % CI: 95.5 % - 100 %	**99.2 %** (117/118) 95 % CI: 95.4 % - 99.9 %

* Cuando se analizó un espécimen de zika archivado, luego de ser retirado del archivo, dio un valor de C_T por encima del corte de la prueba NS3 para zika desarrollada en el laboratorio. Por lo tanto, el espécimen fue reclasificado como negativo. El espécimen dio un resultado positivo para el zika con la prueba Trioplex, y se presentó como resultado falso positivo.
** Un espécimen de dengue (serotipo 4) generó un C_T de 39,87, el cual representa un resultado negativo. El resultado de la prueba VDEN 1-4 para el espécimen fue positivo para el serotipo 4.

2. Datos secundarios del espécimen

Dos especímenes de orina recolectados de pacientes femeninas sintomáticas que pueden haberse infectado con el virus del Zika durante el brote de zika actual se enviaron al laboratorio de los CDC en Puerto Rico para su análisis. Estos especímenes fueron sometidos a prueba con la Trioplex RCP-TR usando el instrumento MagNA Pure LC 2.0 y la mezcla maestra SuperScript III. Los especímenes también fueron sometidos a prueba con un set de cebador y sonda de VZIK, con una prueba singleplex y una prueba RCP-TR NS3 para el zika desarrollada en el laboratorio. Cada espécimen fue analizado junto con un espécimen de suero coincidente de una paciente recolectado el mismo día en que se recolectó la orina. Los resultados se presentan en la Tabla 26.

Tabla 26: Datos del espécimen de orina

		Trioplex			Singleplex para VZIK	RCP-TR NS3 para zika
Caso 1	DPO	VDEN	CHKV	VZIK		
Suero	3	Neg.	Neg.	32.51	33.21	34.6
Orina	3	Neg.	Neg.	29.34	28.56	31.56

		Trioplex			Singleplex para VZIK	RCP-TR NS3 para zika
Caso 2	DPO	VDEN	CHKV	VZIK		
Suero	2	Neg.	Neg.	29.23	28.56	31.05
Orina	2	Neg.	Neg.	27.45	27.12	29.6

DPO = Días posteriores a la aparición de los síntomas

Especímenes de líquido amniótico y LCR:
Cuatro especímenes de líquido amniótico y dos de LCR, todos con resultados de virus del Zika de especímenes de suero coincidentes, fueron evaluados con la RCP-TR. Los resultados del análisis de la RCP-TR de los especímenes de líquido amniótico y LCR coincidieron con los resultados del virus del Zika de especímenes de suero, en todos los casos.

3. Evaluación de espécimen artificial
La prueba se realizó en dos rondas. Para la primera ronda, se utilizaron 50 especímenes negativos de suero humano para preparar especímenes artificiales a fin de evaluar el desempeño de la Trioplex RCP-TR. Cada espécimen fue almacenado en partes alícuotas en 3 tubos. Una parte alícuota de cada espécimen no se adicionó (50 del grupo 15 de especímenes). Las partes alícuotas restantes (n=100) se distribuyeron en subgrupos y se añadieron con los virus enteros según se detalla en los grupos de especímenes 1-13 en la Tabla 27 a continuación. Para la segunda ronda de pruebas, se prepararon otros 25 especímenes de suero artificiales: 15 según se definió para el grupo 14 de especímenes, y 10 más negativos (grupo 15 de especímenes) para que se mezclaran con ellos.

El nivel de adición bajo para el Zika (Polinesia Francesa 2013) fue de aproximadamente 1.5-3 x LoD, el nivel moderado fue de aprox. 100 x LoD, y el nivel alto, de 1000 x LoD aprox. Para el dengue (serotipo 2, Puerto Rico 1998) y el chikunguña (Puerto Rico 2014), el nivel de adición bajo fue de 5-10 x LoD y el alto fue de 100-150 x LoD.

Las partes alícuotas fueron analizadas en condiciones de enmascaramiento y se transmitieron a un operador para su análisis mediante la Trioplex RCP-TR. La extracción se realizó usando el instrumento MagNA Pure LC 2.0 y la RCP-TR se llevó a cabo con la mezcla maestra SuperScript III. Los resultados de la prueba se resumen en la Tabla 28. El acuerdo entre los resultados esperados y los resultados de la prueba para los tres sets de cebador y sonda fue del 100 %.

Tabla 27: Plan de adición para el estudio de especímenes artificiales

N. º de grupo de especímenes	N	Zika	dengue	chikunguña
1	5	Moderado	-	-
2	5	-	Bajo	-
3	5	-	-	Bajo
4	5	Alto	-	-
5	5	-	Alto	-
6	5	-	-	Alto
7	10	Moderado	Alto	-
8	10	Moderado	-	Alto
9	10	Alto	Bajo	-
10	10	-	Bajo	Alto
11	10	Alto	-	Bajo
12	10	-	Alto	Bajo
13	10	Alto	Alto	Alto
14	15	Bajo	Alto	Alto
15	60	-	-	-

Tabla 28: Resumen de resultados de especímenes artificiales.

	Positivo alto		Positivo moderado		Positivo bajo		Negativo	
	Analizados	Positivos	Analizados	Positivos	Analizados	Positivos	Analizados	Positivo
Zika	35	35	25	25	15	15	100	0
Dengue	50	50			25	25	100	0
Chikunguña	50	50			25	25	100	0

Notas sobre el procedimiento

Envíe comentarios, sugerencias y consultas sobre este procedimiento a LRN@cdc.gov

Referencias

- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, Campbell GL. 2007. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. Emerg Infect Dis. May; 13(5):764-7
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, velez JO, lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. 2008. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis. Aug; 14(8):1232-1239
- CDC VDEN-1-4 Real Time RT-PCR Assay for detection and serotype identification of dengue virus. Instrucciones de empleo cat# KK0128. 2013. http://www.cdc.gov/dengue/clinicalLab/realTime.html